

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vivo*. Rancangan yang digunakan adalah *Randomized Post Test Controlled Group Design* pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan yang mengalami DM tipe 2 yang dikerjakan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Jenis teknik sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah *Simple Randomized Sampling*, sehingga diharapkan sampel memiliki sifat yang homogen sebelum diberi perlakuan. Akan ada beberapa kelompok yang akan diberi perlakuan, lalu selanjutnya akan dilakukan pengukuran pada akhir penelitian, kemudian hasil dari pengukuran tersebut akan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak mendapatkan perlakuan.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur Wistar. Tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang berusia 6-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Pada penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan sebagai berikut.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kontrol Negatif	Pemberian diet normal dan tidak diberi <i>Streptozotocin</i> (STZ)
Kontrol Positif	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ (model DM tipe 2), tetapi tidak diberikan terapi
Perlakuan I	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 50 mg/kg BB
Perlakuan II	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 100 mg/kg BB
Perlakuan III	Pemberian diet tinggi lemak, diinduksi STZ, kemudian diberikan ekstrak kulit tomat dengan dosis 150 mg/kg BB

4.2.1 Perhitungan Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus Indra (1999):

$$n = \frac{(15 + p)}{p}$$

Keterangan:

t : Jumlah pengulangan/ besar sampel dalam kelompok

p : Jumlah perlakuan/ besarnya kelompok

Subjek pada penelitian ini dibagi menjadi 5 (lima) kelompok perlakuan. Oleh karena itu, jumlah sampel yang digunakan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah:

$$n = \frac{(15 + p)}{p}$$

$$n = \frac{(15 + 5)}{5}$$

$$n = \frac{20}{5}$$

$$n = 4$$

Jumlah sampel untuk kelima kelompok perlakuan adalah jumlah kelompok dikalikan dengan jumlah sampel perlakuan yang dibutuhkan dari tiap kelompok yaitu:

$$5 (\text{jumlah kelompok perlakuan}) \times 4 (\text{jumlah perlakuan}) = 20$$

Jumlah minimal sampel yang dibutuhkan adalah 20 (dua puluh) ekor tikus jantan. Peneliti menambahkan 2 (dua) ekor tikus pada tiap kelompok yang digunakan sebagai cadangan apabila terdapat tikus yang mati ketika penelitian sedang berjalan.

4.3 Kriteria Sampel

4.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan.
- Warna bulu putih.
- Usia 6-8 minggu.
- Berat badan 150 - 200 gram.
- Kondisi sehat, aktif, dan tidak terdapat kelainan anatomi.

4.3.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus yang mati selama penelitian.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak kulit tomat (*Solanum lycopersicum*).

4.5.2 Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah sensitivitas insulin pada tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, berat badan, usia, kondisi lingkungan kandang, dan pakan.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model DM Tipe 2

Berdasarkan penelitian Zhang (2008), menunjukkan bahwa kombinasi antara HFD dan dosis rendah injeksi STZ dapat secara efektif digunakan untuk menghasilkan tikus model DM tipe 2 yang memiliki karakteristik metabolisme yang mirip dengan DM tipe 2 pada manusia.

4.6.2 Ekstrak Kulit Tomat

Hasil ekstraksi kulit buah tomat dengan pelarut aseton dan dosis ekstrak kulit buah tomat yang digunakan adalah 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 150mg/kgBB.

4.6.3 Sensitivitas Insulin

Pengukuran sensitivitas insulin pada tikus dapat menggunakan rumus $1/[\log (I(0)) + \log (G(0))]$. Pada penggunaan rumus tersebut dibutuhkan kadar serum insulin yang disimbolkan dengan $(I(0))$ dan kadar glukosa darah yang disimbolkan dengan $(G(0))$ pada tikus (Katz *et al.*,

2011). Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan *Glucose Check Test*, sedangkan pengukuran kadar serum insulin menggunakan metode ELISA.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Bahan Penelitian

4.7.1.1 Bahan Pemeliharaan Tikus

- Pakan (normal dan *high fat*)
- Air minum
- Sekam

4.7.1.2 Bahan Larutan STZ

- *Streptozotocin* 100 gram
- Buffer sitrat 3 ml
- Aquades

4.7.1.3 Bahan Pakan Normal

- BR 1 250 gram
- Tepung terigu 750gram
- *Palm olein*
- Air

4.7.1.4 Bahan Pakan Tinggi Lemak

- BR 1 221,75 gram
- Tepung terigu 123,25 gram
- Asam cholate 0,098 gram
- Kolesterol 7,105 gram
- Minyak babi 184,25 gram

4.7.1.5 Bahan Ekstrak Kulit Tomat

- Tomat merah segar
- Aquades
- Aseton
- Etanol

4.7.2 Alat Penelitian

4.7.2.1 Alat Pemeliharaan Tikus

- Rak tempat meletakkan kandang tikus
- Kandang plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
- Tutup kandang dari anyaman kawat
- Wadah tempat makan tikus
- Botol air minum tikus
- Timbangan neraca digital merek "Sartorius melter" dengan ketelitian 0.1

4.7.2.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

- Sarung tangan
- Timbangan "Sartorius melter"
- Gelas ukur
- Loyang
- Mangkok plastik

4.7.2.3 Alat Induksi Streptozocin

- Spuit disposable "terumo" 1 ml
- Spuit disposable "terumo" 3 ml

4.7.2.4 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Tomat

- Rotary evaporator merek IKA
- Blender
- Kompor
- Timbangan
- Baskom
- Loyang
- Gelas ukur
- Kertas saring
- Aluminium foil
- Dandang

4.7.2.5 Alat Pengukuran Glukosa Darah Tikus

- Alat pengukur glukosa digital merek "easy touch"
- Jarum 26g
- Kain
- Air hangat

4.7.2.6 Alat Pembedahan Tikus

- Gunting bedah
- Alkohol 70%
- Sterofoam
- Jarum pentul

4.7.2.7 Alat Pengambilan Serum Darah Tikus

- Spuit disposable "terumo" 5ml
- Tabung vacutainer "onemed" 3ml
- Tabung endorf "onemed"

4.7.2.8 Alat Pemeriksaan Kadar Insulin Tikus

- *Micro plate reader*
- Rat Insulin ELISA Kit

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan dipelihara di dalam kandang di Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUB. Sebelum penelitian dimulai, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu dan ditimbang berat badannya. Selama beradaptasi, tikus diberi pakan normal masing-masing sebanyak 25 gram dan minum yang diganti sekali setiap hari. Penggantian sekam juga dilakukan setiap tiga hari sekali, namun saat setelah penginduksian STZ dan tikus menunjukkan gejala DM yaitu pengeluaran urin yang banyak, maka penggantian sekam dilakukan setiap hari.

4.8.2 Pembuatan dan Pemberian Pakan Normal

Pakan normal yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crumble* yang terbuat dari campuran BR1, tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *palm olein*, dan air. Setelah semua bahan dicampur menjadi satu, selanjutnya campuran tersebut dicetak, lalu dikeringkan sampai kering. Pemberian pakan normal ini diberikan sebanyak 25 gram pada setiap tikus yang diisi ulang setiap harinya. Pakan normal diberikan pada semua kelompok pada saat masa adaptasi, dan pada kelompok kontrol negatif diberikan hingga akhir penelitian.

4.8.3 Pembuatan dan Pemberian Pakan Tinggi Lemak

Pakan tinggi lemak pada penelitian ini terbuat dari campuran BR1, tepung jagung, tepung kacang hijau, tepung terigu, *palm olein*, air, dan minyak babi. Setelah semua bahan dicampur menjadi satu, selanjutnya campuran tersebut dicetak, lalu dikeringkan sampai kering. Pemberian pakan tinggi lemak ini diberikan sebanyak 25 gram pada setiap tikus yang diisi ulang setiap harinya. Pakan tinggi lemak diberikan pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan mulai dari minggu ke dua hingga akhir penelitian.

4.8.4 Injeksi Larutan STZ pada Tikus Putih

Cara injeksi larutan STZ adalah sebagai berikut:

- a. Tikus diposisikan dengan abdomen menghadap ke arah penyuntik.
- b. Pada bagian abdomen didesinfeksi dengan menggunakan alkohol 70%.
- c. Kulit tikus dicubit hingga ke bagian otot.
- d. Spuit ditusukkan pada bagian abdomen dan akan terasa agak keras bila sudah di bagian intraperitoneal.
- e. STZ diinjeksikan pada daerah intraperitoneal.
- f. Bila telah selesai, bagian yang disuntik disemprotkan kembali dengan alkohol 70%.

4.8.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Kulit Tomat

Cara ekstraksi kulit tomat adalah sebagai berikut:

- a. Tomat ditimbang dan dicuci
- b. Tomat yang sudah dicuci, dimasukkan ke dalam dandang yang sudah berisi air kemudian dikukus hingga kulit dan dagingnya terpisah.
- c. Kulit tomat dikupas dan ditata di loyang, kemudian dijemur hingga kering.
- d. Setelah kering, kulit tomat dihaluskan menggunakan blender hingga berbentuk seperti serbuk.
- e. Ekstrak kulit tomat yang sudah menjadi serbuk dicampurkan dengan aceton untuk mengikat aceton kemudian disimpan dalam botol kaca yang dibungkus dengan aluminium foil.
- f. Filtrasi dilakukan untuk mengambil cairan kuning (aseton dan likopen) dari ekstrak tomat.
- g. Evaporasi dilakukan untuk memisahkan likopen dan aceton menggunakan alat rotary evaporator.
- h. Ekstrak kulit tomat yang sudah jadi, lalu dicampur dengan cortina agar lebih mudah larut dengan lemak.
- i. Ekstrak kulit tomat yang sudah dicampurkan dengan cortina, dimasukkan ke dalam kapsul yang masing-masing berisi 0,5 gram. Setiap tikus mendapat dua kapsul yang diberikan secara per oral sesuai dengan dosisnya masing-masing setiap hari.

4.8.6 Pengukuran Kadar Glukosa Darah Tikus

Cara mengukur kadar glukosa darah tikus adalah sebagai berikut:

- a. Tikus dipegang menggunakan kain agar tidak terlalu bergerak.
- b. Ekor tikus dicelupkan ke air hangat untuk meningkatkan vasodilatasi pembuluh darah, sehingga vena lebih mudah terlihat.
- c. Ekor diberi alkohol untuk desinfeksi kemudian ditusuk menggunakan jarum.
- d. Ekor diurut hingga ke distal supaya darah keluar melalui tempat yang ditusuk.
- e. Darah yang sudah keluar ditempelkan pada stik alat ukur digital kemudian dilihat hasilnya pada layar dimana satuan skala pengukuran yang terbaca mg/dl. Apabila kadar glukosanya ≥ 140 mg/dL berarti tikus tersebut positif diabetes melitus.

4.8.7 Pengukuran Kadar Serum Insulin

Prosedur pengukuran kadar serum Insulin adalah sebagai berikut:

- a. Letakkan reagen dan sample pada suhu ruangan ($18 - 25^{\circ}\text{C}$) sebelum digunakan.
- b. Campurkan $100 \mu\text{l}$ pada setiap standard dan sample ke tempat yang telah disediakan. Lalu, ditutup dan diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu ruangan.
- c. Buang larutan dan cuci sebanyak 4 kali dengan 1 kali menggunakan larutan cucian. Cuci dengan cara diisi dengan larutan buffer ($300 \mu\text{l}$) dengan menggunakan *multi-channel pipette* atau dengan *autowasher*. Pindahkan semua cairan

untuk mendapatkan hasil murni yang baik. Setelah pencucian yang terakhir, singkirkan semua cucian penyangga dengan cara dituangkan. Balik piring lalu dibersihkan dengan tisu.

- d. Campurkan 100 μ l *biotinylated antibody*. Inkubasi dan kocok selama 1 jam pada suhu ruangan.
- e. Buang larutan. Lalu dicuci seperti langkah pencucian di atas.
- f. Tambahkan 100 μ l larutan Streptavidin. Inkubasi dan kocok selama 45 menit pada suhu ruangan.
- g. Buang larutan. Lalu dicuci seperti langkah pencucian di atas.
- h. Tambahkan 100 μ l reagen substrat TMB. Inkubasi dan kocok selama 30 menit pada suhu ruangan dengan keadaan ruangan gelap.
- i. Tambahkan 50 μ l larutan stop. Lalu, lakukan pembacaan pada 450 nm.

4.8.8 Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah:

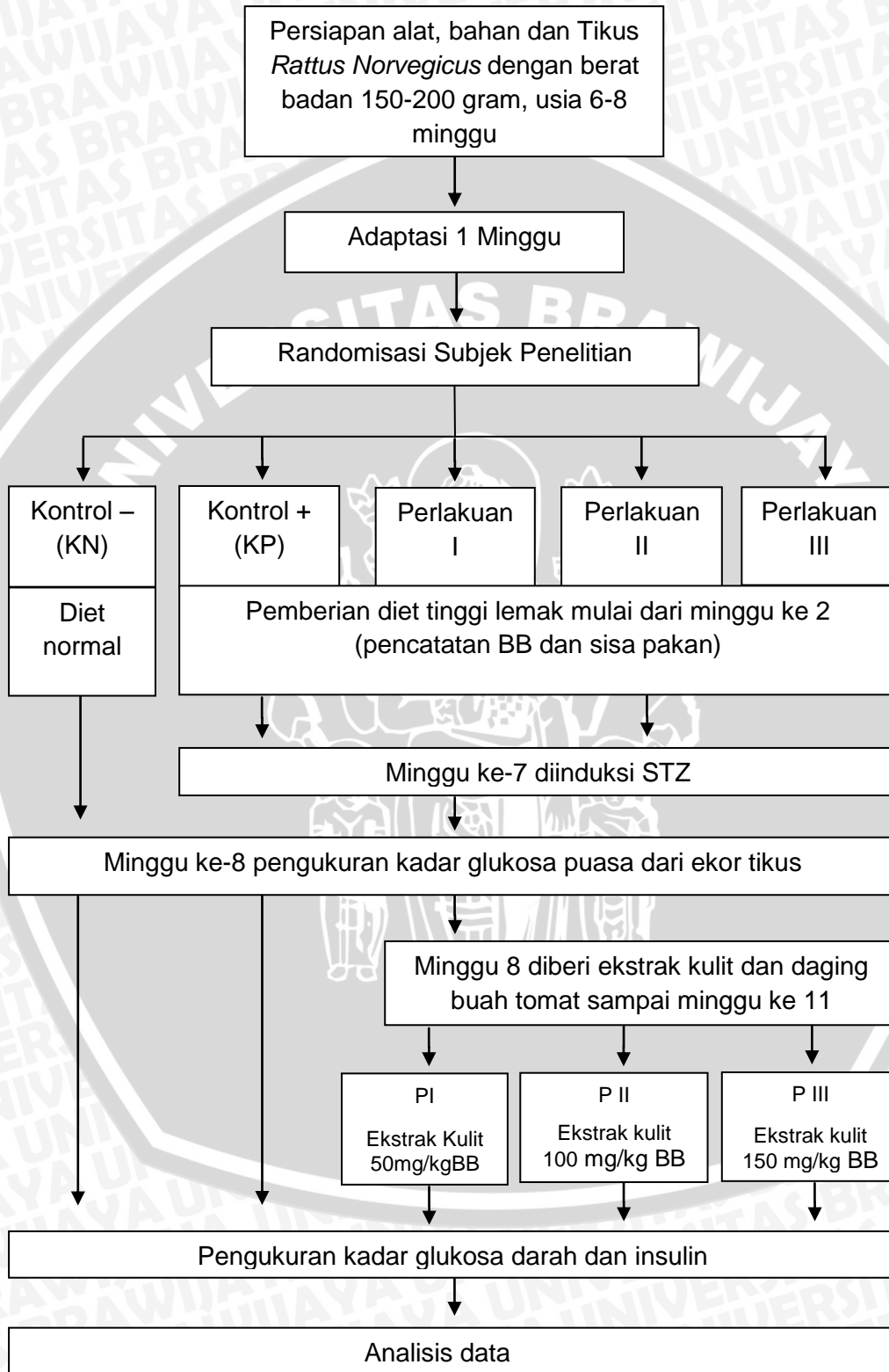
- a. Sisa pakan tikus yang dihitung setiap hari.
- b. Berat badan tikus yang diukur setiap minggu.
- c. Kadar glukosa darah yang diukur sebelum penginduksian STZ dan satu minggu setelah penginduksian.
- d. Kadar serum insulin yang diukur pada akhir penelitian menggunakan *Elisa reader*.

4.9 Analisis Data

Seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Program *SPSS for windows Versi 16.0*. Analisis data dalam penelitian ini meliputi:

- a. Uji normalitas dengan uji *saphiro-wilk* untuk mengetahui normalitas distribusi data.
- b. Uji Homogenitas dengan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data antar kelompok.
- c. Analisis komparasi dengan *One Way Anova* jika data berdistribusi normal dan homogen dan menggunakan uji *Kruskal Wallil* jika data tidak berdistribusi normal atau data tidak homogen.
- d. Uji *Post-hoc* dilakukan untuk mengetahui kelompok-kelompok yang mempunyai perbedaan.
- e. Uji korelasi regresi untuk mengetahui hubungan terapi ekstrak kulit tomat terhadap insulin.

4.10 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian